Aus der Universitäts-Frauenklinik in Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. med. H. Limburg

DIE SERUMPROTEINVERÄNDERUNGEN BEIM COLLUMCARCINOM

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von
Margret WELKER

1970

Dekan: Prof. Dr. med. G. Dhom
Referent: Priv. Doz. Dr. med. G. Loskant

Aus der Universitäts-Frauenklinik in Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. med. H. Limburg

DIE SERUMPROTEINVERÄNDERUNGEN BEIM COLLUMCARCINOM

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von
Margret WELKER

Dekan: Prof. Dr. med. G. Dhom
Referent: Priv. Doz. Dr. med. G. Loskant

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Die mündliche Promotionsprüfung wurde am 6. August 1970 abgelegt.

Inhaltsverzeichnis

I. Fragestellung

II. Überblick über die
1. menschlichen Serumeiweißkörper
2. ihre Nachweismethoden

III. Untersuchungsmethodik und Ergebnisse
1. Elektrophorese
2. Partigen (R) - Immundiffusion
3. Aufschlüsselung des Patientengutes
4. Ergebnisse

IV. Diskussion

V. Zusammenfassung

VI. Literaturverzeichnis

I. Fragestellung

Es hat sich erwiesen, daß der gesunde Körper die Größe der verschiedenen Eiweiß-Komponenten des Blutserums sehr konstant zu erhalten vermag, und daß eine Änderung derselben erst unter bestimmten pathologischen Bedingungen erfolgt (2).

Im Hinblick auf derartige mögliche Veränderungen haben wir die Seren von Patientinnen, bei denen ein Collumcarcinom festgestellt wurde, vor und nach der Strahlentherapie untersucht. Dabei interessierte uns besonders die Frage nach diagnostisch verwertbaren Serumeiweißverschiebungen.

Zunächst erfolgt die Zusammenstellung und Auswertung unserer mit Hilfe der Mikrozonen-Elektrophorese gefundenen Untersuchungen im Vergleich mit einem Kollektiv klinisch gesunder Frauen. Im Anschluß daran besprechen wir die Ergebnisse der einfachen radialen Immundiffusion auf Partigen $^{(R)}$ -Platten, ebenfalls im Vergleich mit einem Normalkollektiv.

Veränderungen, die auf das Alter der Patientinnen und auf die Strahlenwirkung zurückzuführen sind, finden besondere Berücksichtigung.

II. Überblick über den heutigen Stand der Kenntnisse

1. Fraktionen

Das menschliche Blutserum besteht zu etwa 7 bis 8g% aus Eiweißkörpern. Der weitaus größte Anteil davon entfällt auf das Albumin (4 bis 5 g%), und den kleineren Teil bilden die Globuline, die keine einheitliche Fraktion darstellen (38), sondern sich wieder in vier Komponenten auftrennen lassen, nämlich α_1, α_2, β und γ-Globuline. Das Albumin wird zu etwa 95 % in der Leber gebildet und dort auch gespeichert (2). Nicht unwesentlich ist auch die Bildung in der Darmschleimhaut (38).

Als Bildungsstätten der Globuline kommen zusätzlich noch Knochenmark, Milz, Plasmazellen, Makrophagen, Lymphozyten, also bestimmte Zellen des RHS in Betracht (2).

Albumine

wandern bei der Elektrophorese mit der größten Geschwindigkeit,da sie die größte elektrische Ladung haben (IEP bei pH 4,6) und gleichzeitig die kleinsten Moleküle unter den menschlichen Bluteiweißen sind. Ihr Molekulargewicht beträgt 69 000. Sie sind ungefähr 150 Å lang und 38 Å breit (7). Von allen Blutproteinen

II. Überblick über den heutigen Stand der Kenntnisse

1. Fraktionen

Das menschliche Blutserum besteht zu etwa 7 bis 8g% aus Eiweißkörpern. Der weitaus größte Anteil davon entfällt auf das Albumin (4 bis 5 g%), und den kleineren Teil bilden die Globuline, die keine einheitliche Fraktion darstellen (38), sondern sich wieder in vier Komponenten auftrennen lassen, nämlich α_1, α_2, β und γ-Globuline. Das Albumin wird zu etwa 95 % in der Leber gebildet und dort auch gespeichert (2). Nicht unwesentlich ist auch die Bildung in der Darmschleimhaut (38).

Als Bildungsstätten der Globuline kommen zusätzlich noch Knochenmark, Milz, Plasmazellen, Makrophagen, Lymphozyten, also bestimmte Zellen des RHS in Betracht (2).

Albumine

wandern bei der Elektrophorese mit der größten Geschwindigkeit,da sie die größte elektrische Ladung haben (IEP bei pH 4,6) und gleichzeitig die kleinsten Moleküle unter den menschlichen Bluteiweißen sind. Ihr Molekulargewicht beträgt 69 000. Sie sind ungefähr 150 Å lang und 38 Å breit (7). Von allen Blutproteinen

kommt das Albuminteilchen der Kugelform am nächsten. Deshalb können Albuminlösungen auch nur eine geringe Viskositätserhöhung bewirken. Wegen des großen Wasserbindungsvermögens und der starken elektrischen Ladung zeichnen sich aber die Albuminlösungen durch besonders starke Stabilität aus (47). Dem Albumin fällt die Aufgabe zu, das Plasmavolumen und besonders den kolloidosmotischen Druck zu erhalten. Außerdem hat es Vehikelfunktion für Bilirubin, Calcium, Sulfonamide usw. (7). Es bindet also vorzugsweise Stoffe mit hydrophilen Eigenschaften (47). Beim gesunden Menschen macht es 65 bis 70 % des gesamten Bluteiweißes aus (7).

Bei krankhaften Prozessen ist es fast immer relativ vermindert zugunsten der Globuline (2). Ein Teil der Fraktion enthält Lipoide, die sich im Immunpräzipitat durch Fettfärbung darstellen lassen (22).

Im Gegensatz zum Albumin kristallisiert das Serumglobulin nicht, denn die "Kristallisierfähigkeit ist der Ausdruck einer gleichartigen Baustruktur und Faltung der Polypeptidketten" (47).

α-Globuline

haben ein Molekulargewicht von 2 bis 300 000 bei einer Länge von 300 Å und einer Breite von 50 Å (7). Sie sind Träger von Lipo- und Glukoproteiden (47), außerdem von fettlöslichen Vitaminen und Hormonen, von Kupfer, Eisen, Phosphaten und von Hypertensinogen (2). Ihr

durchschnittlicher Gehalt im Blut beträgt 2 bis 6 %. Bei akuten Entzündungen, Gewebsdestruktionen, Nephrose und Plasmocytom treten sie vermehrt auf (7).

β -Globuline

sind Transportmedium für Eisen, Phosphatide, Lipoproteine und für einige Vitamine und Hormone. Wegen ihrer Eigenschaft als Hauptlipoidträger des Blutplasmas manifestieren sich Störungen des Fettstoffwechsels in deutlichen Änderungen der α - und β-Fraktionen (47). Bei entzündlichen Prozessen, nephrotischem Syndrom und Plasmocytom werden sie vermehrt im Blut angetroffen. Sonst schwankt der Blutgehalt zwischen 9 und 13 %. Ihr Molekulargewicht beträgt 90 000 bis 1 300 000 (7).

γ -Globuline

sind verantwortlich für die immunologische Abwehr des Körpers. Chemisch sind sie einheitlich aber serologisch sehr heterogen (47). Sie bestehen größtenteils aus Antikörpern und sind Transportmedium für Lactoflavin (7).

Bei Virusinfektionen, Leberzirrhose, Kollagenosen und chronischen Entzündungen finden wir sie vermehrt (2). Ihr Anteil beträgt etwa 14 bis 18 % und ihr Molekulargewicht 156 bis 300 000 (7). Seit TISELIUS bezeichnet man mit " γ -Globulin" die im elektrischen Feld am langsamsten wandernde Fraktion (40). Die Moleküle haben unter den Serumeiweißen die geringste elektrische Ladung. Ihr IEP liegt bei pH 6,4 (38).

Die hier angeführten Prozentzahlen der einzelnen Bluteiweißkomponenten können nur als ganz grober Anhalt betrachtet werden. Da die Ergebnisse je nach der angewendeten Methode sehr stark variieren, können keine vergleichbaren Absolutwerte angegeben werden. Außerdem zeigt sich eine deutliche Altersabhängigkeit in der Verteilung der einzelnen Fraktionen. Bei klinisch gesunden Personen unter 65 Jahren entfällt weit mehr als die Hälfte der Serumeiweiße auf die Albumine. Nach dem 65. Lebensjahr sinken die Albuminwerte bis auf 1/3 ab, und gleichzeitig werden alle Globulinfraktionen vermehrt gefunden, besonders die γ-Globuline (30). Die Zusammensetzung der Bluteiweiße unterliegt auch erheblichen individuellen Schwankungen. Weiterhin kann auch die Art der Blutentnahme die Eiweißzusammensetzung beeinflussen. Nach einer sechs Minuten bestehenden Stauung ist ein deutlicher Anstieg der Albumine zu verzeichnen (7). Nach körperlicher Belastung finden wir genau das Gegenteil vor, nämlich ein Absinken der Albumine bei gleichzeitigem Anstieg der Globuline (24). Vorhergehende Nahrungsaufnahme dagegen beeinflußt die Elektrophorese nicht.

2. Komponenten

Saures α_1-Glykoprotein (= α_1-Seromucoid = Orosomucoid = α_1-Mucoprotein)
zeichnet sich durch einen extrem niedrigen IEP aus.

Er liegt bei pH 1,8. Das Molekulargewicht beträgt 44 100. 44,1 % des Moleküls bestehen aus Kohlehydraten. Beim gesunden Erwachsenen finden wir es zu 1 bis 1,5 % des Gesamteiweißes. Es tritt vermehrt auf bei allen Krankheiten, die mit Gewebsabbau einhergehen, bei entzündlichen und degenerativen Prozessen, sowie bei Kollagenkrankheiten (26).

α_1-Antitrypsin (= α-Trypsininhibitor)

bildet ungefähr die Hälfte der in der Papierelektrophorese ermittelten α_1-Fraktion (25).

Zu den α_2-Globulinen gehören:

α_2-Makroglobulin
Coeruloplasmin
Haptoglobin

α_2-Makroglobulin

ist ein Riesenglobulin. Sein Molekulargewicht beträgt 900 000, sein Kohlehydratgehalt 8,5 %. Das Molekül ist aus mehreren gleichartigen Monomeren aufgebaut, die sich durch 5molare Harnstofflösung wieder spalten lassen. OH-Gruppen gewährleisten die intramolekulare Bindung. Es bildet etwa 4/5 der α_2-Globulin-Fraktion und zeigt eine auffallende Vermehrung beim nephrotischen Syndrom (26).

Coeruloplasmin

ist ein blaues, kupferhaltiges α_2-Globulin mit einem Molekulargewicht von 151 000 und einem Kupfergehalt von 0,34 %. Das entspricht 4 Atomen Kupfer pro Molekül. Mit 0,5 % des Gesamteiweißes grenzt es nahe an die Spurenproteine. Beim gesunden Organismus ist fast das gesamte Serumkupfer in Coeruloplasmin eingebaut. Durch die Ascorbinsäure wird es reduziert, wobei die Farbintensität abnimmt. Coeruloplasmin zeichnet sich durch seine enzymatische Aktivität aus, und zwar wirkt es wie eine Oxydase. Die antigenen Eigenschaften sind dagegen nur schwach, werden aber durch Östrogene stimuliert; das Coeruloplasmin wird in der Gravidität vermehrt gefunden.
Die Bildung erfolgt wahrscheinlich in der Leber (26).

Haptoglobin

kommt in drei verschiedenen erblichen Formen vor:
Hp 1 - 1 ist ein monomeres Molekül mit einem Molekulargewicht von 85 000.
Hp 2 - 2 ist das dimere Molekül und hat dementsprechend das Molekulargewicht 170 000.
Hp 2 - 1 schließlich ist die Mischform aus beiden (26).
Haptoglobin wird hauptsächlich in der Leber gebildet und tritt bei Parenchymschäden vermindert auf. Bei akuten hämolytischen Anämien fehlt es völlig (32). Es bin-

det Hämoglobin spezifisch und führt es immer wieder den Abbaustellen zu. Erst wenn die Hämoglobin-Bindungs-Kapazität überschritten ist, kommt es zur Hämaturie. Auf diese Weise wirkt es als Eisen-Spar-Mechanismus. Der Komplex Hp - Hb hat die Eigenschaft einer Peroxydase (26) und wandert in der α_2-Fraktion (32), an der er zu etwa 1/4 beteiligt ist (1).

Lipoproteine

sind, wie schon der Name sagt, durch einen besonders hohen Fettgehalt charakterisiert. Er schwankt zwischen 40 bis 98 %. Wegen ihres großen Calorienreichtums sind sie besonders wichtig für den Energiestoffwechsel. Ihre verschiedenen Esterformen erlangen als Phosphatide und Cholesterinester spezifische Bedeutung für viele Gewebe, besonders für das Nervensystem. Das spezifische Gewicht der Lipoproteine liegt weit unter dem der übrigen Serumproteine (26).

β_1-A-Globulin

ist eine sehr kleine Fraktion, die in frischen Seren β_2-Stellung einnimmt. Im Laufe des Alterungsprozesses wandelt sie sich in ein β_1-Globulin (26).

Transferrin (=Siderophillin)

bindet dreiwertiges Eisen zu einem roten Globulin. Der Kohlehydratgehalt beträgt 5,9 %, das Molekulargewicht 88 000. Ein Molekül Transferrin kann zwei Moleküle Eisen binden, d. h.

88 000 g Transferrin binden 112 g Fe
oder 1 g Transferrin bindet 1,25 mg Fe
1 g Transferrin bindet 1,42 mg Cu

Die Affinität des Proteins zu Eisen ist aber 10^7 mal größer als die zu Kupfer. Die Funktion des Transferrins besteht in einer unspezifischen Infektabwehr (26). Außerdem bewahrt es das Eisen vor der Ausscheidung. Transferrinanstieg ist immer ein Zeichen für Eisenmangel. Besonders hohe Werte findet man in der Gravidität. Bei akuten Infektionen und beim nephrotischen Syndrom dagegen sinkt der Transferringehalt des Blutes erheblich ab (32).

γ-Globuline

bilden den Hauptanteil der Immunglobuline. Das sind "Eiweißkörper mit Antikörperspezifität" (26). Sie stellen eine Sonderform eines hochspezifischen Transportglobulins dar, dem die Aufgabe zufällt, die zirkulierenden Antigene zu binden und in unschädlicher Form den Orten ihres Abbaus zuzuführen (26).

Da die humorale Abwehr eng an IgG, IgA und IgM gebunden ist, führt Mangel an einem oder allen Immunglobulinen zu erhöhter Infektanfälligkeit (29). Der Kohlehydratgehalt von ungefähr 3,1 % ist immunologisch bedeutungslos (26).

3. Nachweismethoden

Die hohe Empfindlichkeit der Proteine verlangt besonders schonende Nachweismethoden, dies sind vor allem physikalische Methoden (32).

Wir bedienten uns bei unseren Untersuchungen der Agargel-Elektrophorese in der Modifikation der Mikrozonen-Elektrophorese, wo statt des Agargels eine Zellulose-Acetat-Folie verwendet wird.

Die Folie adsorbiert die Eiweiße weniger als das Filterpapier. Der Untergrund nimmt den Farbstoff praktisch gar nicht an, und die Auftrennndauer ist erheblich verkürzt. Allerdings müssen die Folien sehr behutsam gehandhabt werden, zudem sind sie sehr teuer (26).

Die Moleküle der mit Hilfe der hier erwähnten Elektrophoresemethoden gefundenen Albumin- und Globulinfraktionen haben zwar gleiche Wanderungsgeschwindigkeit, bzw. gleiche elektrische Ladung, hinsichtlich ihrer Größe und Struktur können sie sich aber erheblich voneinander unterscheiden, ebenso in ihrer biologischen Funktion (2).

Als Immindiffusionsmethoden wurden angwandt:
die eindimensionale Immundiffusion nach OUDIN und die zweidimansionale Immundiffusion nach OUCHTERLONY.
Aus diesen Verfahren hat sich die einfache radiale Immundiffusion nach MANCINI entwickelt.

Das Prinzip der Immundiffusionsmethoden liegt darin, daß die einzelnen Glieder der präzipitierenden Antigen-Antikörpersysteme in die flüssige Phase des Gel-Gerüstes gelangen. Von den Maschen des Gel-Gerüstes werden die Präzipitate in ihrer Position gehalten, sodaß durch mechanische Einwirkung keine Verlagerung mehr erfolgen kann.

Eine sehr genaue Methode ist die einfache radiale Immundiffusion, mit deren Hilfe wir in der Lage sind, quantitative Aussagen über die Antigenkonzentration zu machen.

Von einem zylindrischen Startloch aus diffundiert das Antigen in eine gleichmäßig dicke Agargelschicht, in der ein spezifisches Antiserum gelöst ist, wobei sich Präzipitatzylinder ausbilden. Der Durchmesser der Präzipitatzylinder ist der Antigenmenge direkt proportional. Durch geeignete Standardisierungsverfahren läßt sich erreichen, daß der Durchmesser als Funktion der aufgetragenen Antigenmenge aus einer Bezugskurve direkt abgelesen werden kann (6).

Das Verfahren von MANCINI erreicht dadurch absolute Mengenverhältnisse, daß Eichkurven mit Lösungen aufgestellt werden, die einen definierten Eiweißgehalt haben. Der Anteil der aggregierten Eiweiße geht als Fehler in die Berechnung ein.

Um Antiseren und damit die gewünschten Antikörper zu erhalten, sind wir ganz auf Tiere angewiesen, die

immunisiert worden sind. In der Hauptsache werden die Antikörper von Vertretern der Plasmazellreihe gebildet und abgegeben (26). Dabei ist der Antikörperspiegel eine Funktion der Antigendosis. Bei kleinen Dosen besteht ein linearer Zusammenhang (3). Je nach Tierart weisen auch die Antiseren ganz bestimmte charakteristische Eigenschaften auf. Schematisch unterscheiden wir den Kaninchentypus vom Pferdetypus.

Für Plasmaproteinbestimmungen auf Partigen$^{(R)}$-Platten sind die Kaninchenantiseren wegen der Breite des möglichen Konzentrationsbereiches am besten geeignet (6).

III. Untersuchungsmethodik

Zwei Nachweismethoden, die uns als die exaktesten erschienen, haben wir durchgeführt. Es sind dies die Mikrozonenelektrophorese als qualitative und die radiale Immundiffusion als quantitative Methode.

1. Elektrophorese

Die Seren der an Collumcarcinom erkrankten Patientinnen wurden vor und nach der Behandlung elektrophoretisch aufgetrennt im Mikrozone-Verfahren nach BECKMAN (Mikrozone-Elektrophorese-System Modell R - 101).

Die Mikroelektrophoresezelle besteht aus:
Zellwanne
Brücke
und Zelldeckel.
Das Stromversorgungsgerät ist der Duostat.

Die Zellwanne besteht wie der Zelldeckel aus Plexiglas und hat ein Füllvolumen von 265 bis 285 ml. Sie besteht aus zwei völlig voneinander getrennten Elektrolytgefäßen, zwischen denen nur ein Heber bei Entfernung der Brücke einen völligen Niveauausgleich schaffen kann. Normalerweise wird dieser Heber durch das Gewicht der Brücke oberhalb der Flüssigkeitsoberfläche gehalten, sodaß ein Kurzschluß verhindert wird. Zu beiden Seiten der Trennwand durchzieht je eine Platinelektrode die ganze Breite der Wanne. Nach

außen führen die Elektroden durch die Zellwand hindurch in zwei Elektrodenanschlußstecker, die an das Stromversorgungsgerat angeschlossen werden können. Vier Zwischenwande in den Elektrolytgefaßen verlangern künstlich die Diffusionsstrecke und verhindern so eine Diffusion von Elektrolyseprodukten in die Membranenden.

Die Mikrozonen-Elektrophorese-Zelle

Die Brücke trägt zwei besondere Membranhalterungen, die für eine dauernde Spannung der Membran in horizontaler Lage garantieren und zwar so, daß die Membran dicht über der Pufferlösung liegt und nur ihre Enden in sie eintauchen. Durch die Spannung der Membran wird ein Pufferüberschuß verhindert und dabei ein gleichmäßiger Probenauftrag gewährleistet.

Der Zelldeckel liegt unmittelbar über der in die Zelle eingespannten Membran. Er enthält mehrere Rinnen und Auftragsspalten. Zur genauen Fixierung des Stempels dienen acht nummerierte Vertiefungen.

Die Mikromembran ist eine poröse 130 Mikron (1 μ = 0,001 mm) dicke Platte aus einem schwammigen Zellulose-Acetat-Material mit einheitlichen, kugelförmigen Zwischenräumen von weniger als 2 μ, die untereinander in Zusammenhang stehen und so freien Pufferfluß ermöglichen.

Sie adsorbiert keine Proteine, im Gegensatz zum Filterpapier, sodaß keine Schwanzbildungen im Anschluß an die einzelnen Fraktionen auftreten können. Die Fraktionen wandern gleichmäßig und ohne gegenseitige Beeinflussung. Nach Anfärbung und Fixierung wird die Membran zur Auswertung durch ein besonderes Waschbad transparent gemacht.

Der Mikroprobenauftragsstempel garantiert eine stets gleich starke Auftragstelle von optimaler Größe

und Form. Der Zwischenraum zwischen zwei parallelen Lamellen füllt sich durch Kapillarwirkung und nimmt 0,25 µl der Probe (des Serums auf).

Der Stempel wird mit eingezogener Spitze fest in eine der nummerierten Vertiefungen des Deckels gesetzt und dann die Auftragspitze heruntergedrückt.

Das Analytrol (Modell RB)
dient zur densiometrischen Messung und Auswertung gefärbter Elektrophorese- oder Chromatogrammstreifen. Er mißt und schreibt den Verlauf der optischen Dichte entlang des zu messenden Papierstreifens. Die dadurch entstehende Kurve wird gleichzeitig automatisch integriert, wobei die Integratorfeder eine Sägezahnlinie schreibt, die ein Maß für die Fläche unter den registrierten Kurvenabschnitten darstellt.

Densiometer
Der zu messende Papierstreifen wird an der vorderen, messenden Fotozelle vorbeitransportiert. Gleichzeitig wird das Licht einer Wolframlampe durch Linsen über einen schmalen Spalt auf die Meßfotozelle gelenkt. Dieses Lichtbündel durchdringt den Streifen, der ausgewertet werdensoll.

Der Integrator
besteht aus zwei Motoren. Davon läuft der eine mit konstanter Geschwindigkeit, der andere ist ein Servomotor. Durch Koppelung der Bewegungen von Streifen und Schreibfeder erreicht man, daß die Anzahl der von der Integra-

feder geschriebenen Zacken proportional der Fläche unter der aufgezeichneten Kurve ist.

Die Pufferlösung zur Serumproteinauftrennung ist von BECKMAN vorgegeben. Man löst ein Päckchen B_2-Puffer BECKMAN in ein Liter Aqua dest. und erhält so einen Puffer von pH 8,6 und der Ionenstärke 0,075. Es handelt sich um einen Barbituratpuffer.

Die Farbstofflösung wird bereitet, indem man eine Originalflasche (28 ml) BECKMAN Farbstofflösung in 250 ml Aqua dest. löst.

Die Flasche enthält 0,2 Gew. % Ponceau- S
3,0 Gew. % Trichloressig
3,0 Gew. % Sulfosalicylsäure

Das Essigsäurewaschbad findet in 5 %iger CH_3COOH statt. Für das Alkoholbad verwendet man 95 %igen Äthanol und für die Transparenzlösung eine Mischung von 30 Vol% Eisessig und 70 Vol% Äthanol (95 %ig).

Arbeitsgang

Die einzelnen Schritte eines elektrophoretischen Arbeitsganges erfolgen in nachstehender Reihenfolge:
Zunächst füllen wir die Elektrophoresezelle mit Pufferlösung.
Die Membran wird vorgepuffert und zwischen zwei Fließpapieren vorsichtig abgetupft, sodaß nur der überschüssige Puffer abgesaugt wird. Nun spannen wir die

Membran in die Brücke und setzen sie mit der Brücke in die Zelle ein. Man schließt die Elektrodenanschlußstekker an den Duostaten an und wartet zur Equilibrierung zwei Minuten ab.

Dann werden die Serumproben mit Hilfe des Stempels aufgetragen.

Beim Einschalten des Duostaten auf 250 Volt ergibt sich eine Anfangsstromstärke von 3,5 bis 5,8 mA und eine Endstromstärke von 4,5 bis 9,5 mA.

Die Trennzeit beträgt 20 Minuten bei 250 Volt.

Danach nehmen wir die Membran vorsichtig aus der Zelle und bringen sie für 10 Minuten ins Färbebad.

Anschließend wird sie so lange in 5 %iger Essigsäure gewaschen, bis der Grund wieder völlig weiß ist. Dabei muß die Essigsäure mehrmals erneuert werden.

Im Alkoholbad bleibt die Membran genau eine Minute und in der Transparenzlösung genau 3/4 Minute.

Nun bringen wir die Membran auf eine Glasplatte und streifen die überflüssige Transparenzlösung mit einer Gummiquetsche ab.

Im Trockenschrank bleibt die Membran mit der Glasplatte 15 Minuten bei 100° C.

Die nun transparent gewordene Membran legt man in eine Plastikhülle und beschriftet sie.

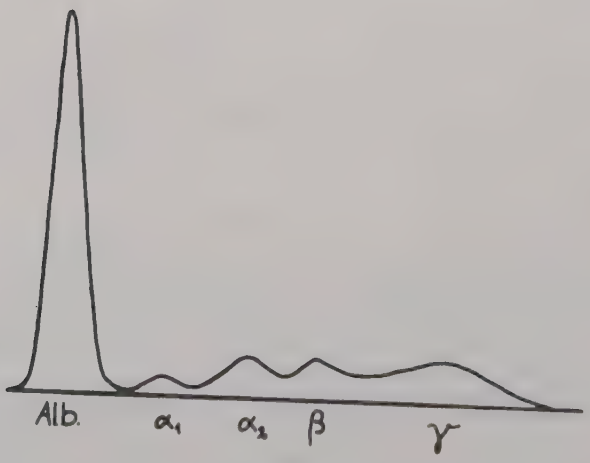
Nach 15 Minuten Vorwärmezeit setzen wir sie in den Analytrol ein und eichen das Gerät.

Nun kann die Registrierung erfolgen.

Das vom Analytrol auf Millimeterpapier geschriebene Diagramm wird ausgewertet.

Auswertung des Diagramms

Man zeichnet auf dem Diagrammpapier für jede Komponente eine Gauss-Kurve. Die Schnittpunkte der Gauss-Kurven sind die Begrenzungen der einzelnen Fraktionen. Die Grenzen werden durch senkrechte Striche über die Integrationskurven eingezeichnet. Die Gesamtzahl der ausgezählten Zacken entspricht 100 Rel. %. Auf einem Spezialrechenschieber der Firma BECKMAN können die Prozentzahlen für die einzelnen Fraktionen leicht abgelesen werden.



Elektrophorese-Diagramm eines Patientenserums

Biuretprobe

Um die Absolutprozente der einzelnen Eiweißfraktionen zu erhalten, führen wir für jedes Serum die Biuretprobe durch. Die Absolutprozente des Gesamteiweißes des Serums entsprechen 100 Rel. %.

Die Biuretprobe begründet sich auf folgendes Prinzip: In alkalischer Lösung geben Proteine, mit wenig verdünntem Kupfersulfat versetzt, eine violette Färbung. Diese beruht auf der Häufung von CO-NH-Gruppen im Molekül, die charakteristisch für Peptidketten ist.

Die Intensität der Färbung kann quantitativ zur kolorimetrischen Bestimmung der Proteine ausgewertet werden.

Zur Durchführung der Probe gaben wir zu 4,9 ml physiologischer Kochsalzlösung 0,1 ml Serum und versetzten das Gemisch mit 5,0 ml Biuretreagenz.

Für den Leerversuch nahmen wir 5,0 ml physiologische Kochsalzlösung und 5,0 ml Biuretreagenz.

Die Messung wurde bei einer Schichtdicke von 2,0 cm und einer Wellenlänge von 530 mu durchgeführt.

Die Ausrechnung erfolgte nach der Gleichung:

$$\frac{\text{Extinktion Unbekannte} \times \text{\% Protein im Serum}}{\text{Extinktion Standard}} = \text{g\% Eiweiß}$$

Die Fehlermöglichkeiten der Elektrophorese sind recht gering. Wenn sich große molekulare Aggregate gebildet haben, bleiben diese Teilchen auf der Folie hängen, und die Fraktionen erscheinen uneinheitlich. (Dies kann sich z. B. an der Auftragstelle bemerkbar machen).

Das gleiche geschieht, wenn die Lamellen des Mikroben-pro-auftragstempels nicht genau parallel stehen. Bei der Extinktionsmessugg wird aber gleiche Proteinkonzentration über Länge und Breite der Spalte gefordert, da sonst zu kleine Werte gemessen werden (2).

Bei ungenügend transparent gemachten Membranen treten Streueffekte auf, die die kleinen Fraktionen höher und die großen niedriger erscheinen lassen (20).

Vorteil:

Durch die sehr hohe Spannung (250 V) wird die Laufzeit auf 20 Minuten herabgesetzt, und die störenden Diffusionserscheinungen können fast völlig ausgeschaltet werden. Auf diese Weise erreichen wir eine besonders saubere Auftrennung der Fraktionen (7).

Für jedes Serum führten wir sechs Elektrophorese-Bestimmungen durch und errechneten dann den Mittelwert.

2. Partigen(R)-Immundiffusion

Eingehende immunoelektrophoretische Untersuchungen haben ergeben, daß das menschliche Blutserum mehr als 30 immunologisch verschieden reagierende Proteine enthält, die bei der herkömmlichen Serumelektrophorese nicht erfaßt werden können, auch nicht bei der von uns durchgeführten Mikrozonen-Elektrophorese.

Die dabei aufgetrennten Fraktionen der Albumine, der α_1-, α_2-, β- und γ-Globuline stellen also keine

einheitliche homogene Eiweißfraktion dar, sondern sie setzen sich wiederum aus vielen Untergruppen zusammen, die sich nur in der Immunoelektrophorese mit spezifischen Antiseren darstellen lassen. Eine genaue quantitative Auswertung ist auch dabei nicht möglich. Mehrfach wurde der Versuch der quantitativen Erfassung der einzelnen Eiweißkomponenten unternommen.

Bewährt hat sich dabei die "einfache radiale Immundifussion in der Modifikation nach MANCINI, CARBONARA und HEREMANS". Eine dünne Agargelschicht, in der ein spezifisch präzipitierendes Anitserum gelöst ist, enthält zylindrische Aussparungen, in die das zu untersuchende Serum eingebracht wird. Dieses diffundiert radial in die Agargelschicht hinein, wobei sich im Laufe der Diffusion ein kreisförmiges Präzipitat um die Auftragstellen herum bildet. Der Durchmesser des Präzipitationskreises ist ein Maß für die Antigenkonzentration im Serum.

Durchführung der Bestimmungen:

Die Partigen$^{(R)}$-Immundiffusionsplatten der Behring-Werke enthalten eine gebrauchsfertige Agargelschicht mit einem spezifischen Plasma-Protein-Antiserum und 12 nummerierten Aussparungen, die genau 2 µl fassen.

Zum Einbringen der Proben benutzen wir eine Mikropipette von BURROUGHS WELLCOME London, mit der exakt 2 µl abgemessen werden können. Um eine möglichst op-

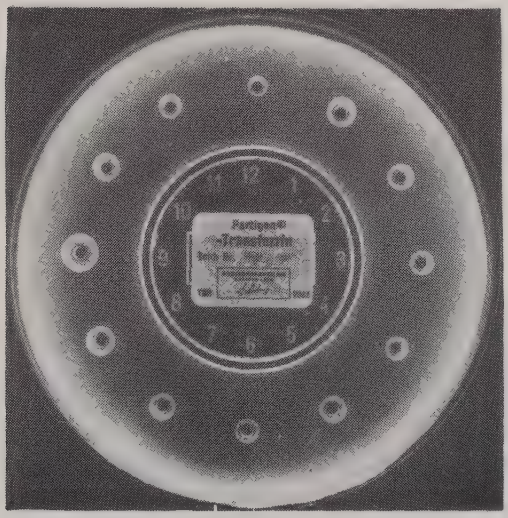
timale Bezugskurve aufzustellen, trugen wir in vier Stanzlöcher einer jeden Platte vier verschiedene Verdünnungen des stabilisierten Standard-Humanserums der Behring-Werke mit bekannter Konzentration auf.

In die verbleibenden acht Stanzlöcher brachten wir je 2 µl eines Patientenserums in der empfohlenen Verdünnung ein. In waagerechter Lage und mit verschlossenem Deckel blieben die Platten nun zwei Tage lang bei Raumtemperatur stehen. Nach 48 Stunden zeigten sich scharfe deutliche Präzipitationskreise, deren Größe sich auch nach Wochen und Monaten nicht mehr veränderte. Wir maßen die Durchmesser mit der zugehörigen Meßschablone auf Zehntelmillimeter genau aus.

Aufstellen der Bezugskurve

Auf linearem Millimeterpapier trugen wir die Quadrate der Ringdurchmesser von vier verschiedenen Verdünnungen der Eichlösung auf. Die Abszisse gab die Antigenkonzentration in mg/100 ml an, die Ordinate die Quadrate der Ringdurchmesser in mm^2, deren Werte auf einer Geraden lagen.

Die quadrierten Werte der Durchmesser der Präzipitationskreise der Carcinom-Seren trugen wir in die Bezugskurve ein und konnten die Proteinkonzentration direkt ablesen. Der so erhaltene Wert mußte nur noch mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert werden.



Partigen (R)-Immundiffusionsplatte

nach erfolgter Präzipitation

Da die Größe des Präzipitationskreises abhängig ist vom Verhältnis der Konzentrationen des in der Partigen-Platte gelösten Antiserums und der in die Stanzlöcher eingebrachten Serumproben, empfehlen sich folgende Verdünnungsverhältnisse:

Zur Bestimmung von	Verdünnung des Serums
Albumin	1: 100
saures α_1-Glykoprotein	1: 4
α_1-Antitrypsin	1: 5
Coeruloplasmin	1: 3
Haptoglobin	1: 6
α_2-Makroglobin	1: 5
β -Lipoprotein	1: 2
β_1-A-Globulin	1: 4
Transferrin	1: 5
IgM	1: 5
IgA	1: 8
IgG	1: 40

Verdünnung des Standard-Humanserums für:				
saures α_1-Globulin	1: 1	1: 2	1: 5	1: 10
α_1-Antitrypsin	1: 2	1: 4	1: 8	1: 16
Coeruloplasmin	1: 1	1: 2	1: 4	1: 8
Haptoglobin	1: 1	1: 2	1: 4	1: 8
α_2-Makroglobulin	1: 1	1: 2	1: 5	1: 10
β_1-A-Globulin	1: 1	1: 2	1: 4	1: 8
Transferrin	1: 2	1: 4	1: 8	1: 16
IgM	1: 1	1: 2	1: 4	1: 5
IgA	1: 2	1: 5	1: 10	1: 20
IgG	1: 10	1: 20	1: 50	1: 100
Albumin	1: 50	1: 100	1: 150	1: 200

Verdünnung 1:1 bedeutet: unverdünnt.

Proteine des Standard-Humanserums in mg/100 ml

Albumin	2910
saures α_1-Globulin	65
α_1-Antitrypsin	120
Coeruloplasmin	15
Haptoglobin	120
α_2-Makroglobulin	115
β 1-A-Globulin	55
Transferrin	180
IgM	55
IgA	130
IgG	740

Das von uns verwandte Standard-Humanserum enthielt kein β-Liporotein, sodaß wir für dieses Protein keine Bezugskurve aufstellen und deshalb auch keine quantitativen Aussagen machen konnten. Es war lediglich möglich, die Durchmessergröße der Präzipitationskreise der Seren vor der Behandlung mit denen nach der Behandlung zu vergleichen und daraus auf Vermehrung oder Verringerung unter der Therapie zu schließen.

Um den Pipettierfehler möglichst gering zu halten, stellten wir von jedem Patientenserum eine Verdünnungsreihe von 1:1 bis 1:100 auf, und zwar nach folgendem Prinzip:

Verdünnung	Serum	0,9 %ige NaCl
1: 1 }		+ 0,5 ml
1: 4 }	je 0,5 ml	↳ 0,5 ml
1: 8 }		→ 0,5 ml
1: 3	0,4 ml	+ 0,2 ml
1: 6	0,2 ml	↳ 0,2 ml
1: 5	0,8 ml	+ 0,2
1: 40	0,7	↳ 0,1
1: 100	1,9	→ 0,1

Fehlermöglichkeiten der Immundiffusion

Trotz groß angelegter Verdünnungsreihen ist der Pipettierfehler nicht ganz auszuschließen.

Die Diffusionsstrecke eines Proteins ist umgekehrt proportional seiner Molekülgröße. Wenn sich großmolekulare Aggregate gebildet haben, erhalten wir entsprechend niedrigere Werte.

Bei zu hohem Antigengehalt des Serums, d. h. bei ungenügender Verdünnung, ergibt die quantitative Bestimmung noch höhere Werte (34), da der Durchmesser des Präzipitationsringes dann ganz vom Verhältnis Antigen-Antikörpergehalt abhängt und nicht mehr von der Antigenmenge.

Schließlich bleibt noch der Ablesefehler zu berücksichtigen. Sollte der Antikörpergehalt der Platten nicht konstant sein, so läßt sich dies leicht durch die Bezugskurve mit den vorher besprochenen vier Eichpunkten ausgleichen.

Die statistische Auswertung aller Untersuchungsergebnisse erfolgte auf Lochkarten nach dem "t-Test" und dem "χ^2-Test". Das Kollektiv I umfaßte die Seren der an Collumcarcinom erkrankten Patientinnen vor der Behandlung, das Kollektiv II die Seren der gleichen Patientinnen nach der Strahlentherapie, und das Kollektiv III setzte sich aus klinisch gesunden Frauen zwischen 25 und 50 Jahren zusammen.

3. Aufschlüsselung des Patientengutes

Wir untersuchten vor und nach der Behandlung das Blutserum von 41 Patientinnen, die an Collumcarcinom erkrankt waren und in dem Zeitraum von Anfang 1967 bis Mitte 1968 in der Universitäts-Frauenklinik Homburg einer Strahlentherapie unterzogen wurden.

Die jüngste Patientin war 29, die älteste 76, 12 Patientinnen waren über 60 Jahre alt. Das Durchschnittsalter betrug 54,2 Jahre.

Bei einer einzigen Patientin konnte das Carcinom bereits im Stadium I festgestellt werden, da sie wegen Gravidität mens II in unsere Sprechstunde kam. Eine Patientin konnte im Stadium I - II und sieben Patientinnen im Stadium II erfaßt werden. Den weitaus größten Teil bildeten 29 Patientinnen mit Collumcarcinom III. Vier Patientinnen kamen erst im Stadium IV zur Behandlung.

Innerhalb des ersten Jahres nach unseren Untersuchungen traten fünf Rezidive auf. Außerdem kamen in diesem Zeitraum vier Patientinnen ad exitum.

Behandlung

In 25 Fällen konnten wir die typische Strahlentherapie durchführen, die in einer Radiumbestrahlung von 6 000 mgelh und einer Röntgentiefentherapie mit der GHD von durchschnittlich 3 000 R bestand. Vier weitere Patientinnen erhielten 6 000 mgelh Ra und wurden

mit dem Telecobaltgerät bestrahlt und zwar mit der GHD 4 500 R, auf Beckenmitte berechnet.

Eine Patientin verließ auf eigenen Wunsch das Krankenhaus vor Ende der Therapie. Bei einer Patientin mußten wir wegen zu starker Adipositas auf die perkutane Röntgenbestrahlung verzichten. Die Radiumbehandlung wurde auch hier in der üblichen Weise mit 6 000 mgelh durchgeführt. Zwei Patientinnen wurden vor der vollen Strahlentherapie noch der Operation nach WERTHEIM-MEIGS unterzogen, und zwei Patientinnen schließlich wurden nach der WERTHEIM-MEIGS-Operation nur mit Radium behandelt.

Zur Kontrolle nach der Behandlung kamen lediglich die Seren von 35 Patientinnen.

4. Ergebnisse

In der Tabelle 1 sind die Ergebnisse der Mikrozonen-Elektrophorese mit ihrer statistischen Auswertung nach dem "t-Test und dem "χ^2-Test" wiedergegeben.

Beide Verfahren haben zu dem gleichen Resultat geführt. Demnach unterscheiden sich die Seren der Patientinnen vor und nach der Behandlung nicht sicher. Es bestehen allerdings signifikante Unterschiede zwischen den Normalseren und den Seren der Carcinomträgerinnen, wobei die Therapie ohne Einfluß auf die Bluteiweißzusammensetzung zu bleiben scheint.

Beim Collumcarcinom fanden wir eine deutliche Verminderung der Albumine bei gleichzeitigem Anstieg der Globuline aller Fraktionen, und dementsprechendem Absinken

A)	I (n = 41)		II (n = 36)		III(n = 56)		t - Test (p -Wert)						χ^2 - Test (p - Wert)		
Fraktion	M	±s'	M	± s'	M	±s'	I/II		I/III		II/III		I/III		I/II
Albumin	58,9	5,8	58,3	6,7	72,5	3,7	ns		<0,0005	ss	<0,0005	ss	<0,00025	ss	ns
α_1-Globulin	3,3	1,1	3,4	1,1	2,1	o,6	ns		<0,0005	ss	<0,0005	ss	<0,00025	ss	ns
α_2-Globulin	1o,8	2,o	1o,7	2,5	7,o	1,1	ns		<0,0005	ss	<0,0005	ss	<0,00025	ss	ns
β-Globulin	11,3	2,2	1o,6	1,9	8,1	1,1	ns		<0,0005	ss	<0,0005	ss	<0,00025	ss	ns
γ-Globulin	15,7	3,6	1o,9	4,o	1o,8	2,4	ns		<0,0005	ss	<0,0005	ss	<0,00025	ss	ns
Albumin/Globulin	1,5	o,4	1,5	o,4	2,7	o,5	ns		<0,0005	ss	<0,0005	ss	<0,00025	ss	ns
B)	I (n = 41)		II (n = 35)		III (n = 64)										
Albumin	4oo7	631	4181	1o56	4452	47o	ns		<0,0005	ss	<0,05	(s)	<0,0125	s	ns
α_1-Globulin	227	77	244	81	1o7	47	ns		<0,0005	ss	<0,0005	ss	<0,00025	ss	ns
α_2-Globulin	736	184	758	199	432	95	ns		<0,0005	ss	<0,0005	ss	<0,00025	ss	ns
β-Globulin	767	211	1o31	151	497	87	ns		<0,0005	ss	<0,005	s	<0,00025	ss	ns
γ-Globulin	1o87	351	1227	441	667	181	ns		<0,0005	ss	<0,0005	ss	<0,00025	ss	ns
Ges.-Eiweiß	6837	1114	7145	1451	6147	669	ns		<0,0005	ss	<0,0005	ss	<0,00025	ss	ns

Tabelle 1 Statistische Auswertung der Serumelektrophorese auf Cellulose-Acetat-Folie

A = Werte in rel%
B = Werte in mg%
M = Mittelwert
s' = Streuung

(s) = schwach signifikant
s = signifikant
ss = hochsignifikant
ns = kein eindeutiger Unterschied

Serumprotein	I (n = 41) M	±s'	II (n = 35) M	±s'	III (n = 16) M	±s'	t-Test (p-Wert) I/II	I/III	II/III	χ^2-Test (p-Wert) I-III	I-II
Albumin	3663	1350	3622	1431	6133	1541	ns	< 0,0005 ss	< 0,0005 ss	< 0,005 ss	ns
saures α_1-Glykoprotein	156	62	161	58	85	21	ns	< 0,0005 ss	< 0,0005 ss	< 0,00025 ss	ns
α_1-Antitrypsin	296	107	308	90	282	52	ns	ns	ns	ns	ns
Coeruloplasmin	47	13	48	14	34	17	ns	< 0,005 s	< 0,005 s	< 0,05 ((s))	ns
Haptoglobin	256	153	307	210	102	54	ns	< 0,0005 ss	< 0,0005 ss	< 0,0025 s	ns
α_2-Makroglobulin	283	76	284	88	371	109	ns	< 0,0025 s	< 0,0025 s	ns	ns
β-Lipoprotein	30	8	30	6	27	7	ns	ns	< 0,05 (s)	ns	ns
α_1A-Globulin	134	34	142	42	120	22	ns	ns	< 0,05 (s)	ns	ns
Transferrin	215	61	205	74	297	54	ns	< 0,0005 ss	< 0,0005 ss	< 0,0025 s	ns
IgM	168	62	157	73	208	60	ns	< 0,0025 s	< 0,0025 s	ns	ns
IgA	359	169	357	222	238	86	ns	< 0,005 s	< 0,025 s	< 0,05 (s)	ns
IgG	1390	445	1463	408	1179	321	ns	< 0,05 (s)	< 0,01 s	ns	

Tabelle 2 Statistische Auswertung der quantitativen einfachen Immundiffusion
Alle Werte in mg%, lediglich bei β-Lipoprotein wurde r^2 angegeben

M = Mittelwert
s' = Streuung

((s)) und (s) = schwach signifikant
s = signifikant
ss = hochsignifikant
ns = kein eindeutiger Unterschied

des Albumin-Globulin-Quotienten. Dabei zeigte sich ein erhöhter Gesamteiweißgehalt.

Tabelle 2 gibt die Ergebnisse der einfachen radialen Immundiffusion wieder, bei der 12 Serumproteine quantitativ erfaßt wurden. Danach fanden wir bei Carcinomträgerinnen eine auffallende Vermehrung folgender Serumproteine:

saures α_2-Glykoportein
Coeruloplasmin
Haptoglobin
IgG
IgA

Eine geringfügige Erhöhung von β_1-A-Globulin und β-Lipoprotein zeigten die Seren nach der Strahlentherapie im Vergleich mit dem Normalkollektiv.

Die hohe individuelle Streubreite mag die folgenden Differenzen in den beiden Testverfahren erklären:

Beim Vergleich der Carcinomträgerinnen vor der Behandlung mit dem Normalkollektiv beziehen sich die Unterschiede auf:

α_2-Makroglobulin
IgM
IgG

Beim Vergleich der Patientenseren nach der Therapie mit den Seren der gesunden Frauen auf:

α_2-Makroglobulin

β-Lipoprotein

β_1-A-Globulin

IgM

IgG

Die Auswertung nach dem "t-Test" und dem "χ^2-Test" stimmen darin überein, daß kein statistisch zu sichernder Unterschied zwischen den Bluteiweißkörpern von Carcinomträgerinnen vor und nach der Behandlung besteht.

IV. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit haben wir die Frage zu klären versucht, ob beim Collumcarcinom charakteristische Serumeiweißverschiebungen auftreten, und in wie weit diese Veränderungen diagnostisch verwertbar sind. Dazu haben wir drei Serenkollektive ausgewertet:

I Collumcarcinom-Seren vor der Therapie
II Collumcarcinom-Seren nach der Bestrahlung
III Seren von klinisch gesunden Kontrollpersonen.

Wir fanden beim Collumcarcinom signifikante Veränderungen der Eiweißfraktion in der Serumelektrophorese:

Erniedrigung der Albumine bei gleichzeitiger Erhöhung der Globuline aller Fraktionen. Der Albumin-Globulin-Quotient ist erniedrigt, die Gesamteiweißwerte sind erhöht.

Von den meisten Autoren wird - übereinstimmend mit unseren Ergebnissen - eine deutliche Albuminverminderung angegeben (2, 4, 5, 12, 13, 15, 28, 30, 33, 47, 48). Diese Hypalbuminämie ist aber uncharakteristisch, da (nach WUHRMANN und WUNDERLY 47) der Körper auf alle krankhaften Zustände monoton mit einer Verminderung der Albumine antwortet, die als eine Kompensation von Schwankungen im Globulinbereich aufzufassen sind.

Die Literaturangaben über die Globulinfraktionen sind widersprüchlich und unterscheiden sich teilweise erheblich von unseren Untersuchungsergebnissen.

Bestätigt werden unsere Befunde bezüglich der Globuline von WUHRMANN und WUNDERLY (47), die bei malignen Tumoren neben einer Albuminverminderung eine gleichmäßige Erhöhung aller Globulinfraktionen angeben. Über gleiche Beobachtungen berichten FUMAGALLI (14), KIENHOLZ (30), LACKNER (31) und LOCHER (33). Von HORN (28) fand bei weiblichen Genital-Carcinomen eine Eiweißverschiebung zugunsten aller Globulinfraktionen bei besonders starker Vermehrung der α-Komponenten. Erst im weit fortgeschrittenen Stadium fand sie ein Überwiegen der γ-Globuline. DORRER (12) fand bei malignen Tumoren eine unspezifische Dysproteinämie, bei der besonders die Vermehrung der α_2- und der γ-Globulinfraktion hervortritt bei normalen Gesamteiweißwerten. Die schubweise Zunahme der α_1 und α_2-Komponenten deutete er als Folge nekrotischer Begleitprozesse im umgebenden Gewebe. Dem entsprechen auch die Ergebnisse von LOCHER (33), der bei Metastasen und entzündlichen Komplikationen eine starke α- und eine weniger starke γ-Globulinerhöhung beschreibt. BAUER (4) berichtet über hohe γ-Globulinwerte bei nur leichter Erhöhung der α_2-Fraktion und normalen α_1- und β-Globulinwerten. ALY (1) spricht die Vermutung aus, daß die Al-

buminverminderung einer α_2-Globulinvermehrung parallel geht, die er als Ausdruck eines akut entzündlichen Geschehens ansieht und damit übereinstimmt mit LOCHER (33) und DORRER (12). VEIT (44) beobachtete ebenfalls einen α-Globulinanstieg bei nekrobiotischen Vorgängen und erklärt dies mit der Vermutung, daß Zellzerfallsprodukte mit der α-Fraktion wandern. γ-Globulinerhöhung tritt nach VEIT bei gesteigerter Abwehrreaktion des RHS ein, während β-Erhöhung für Lebermetastasen sprechen soll.

Nach WIKTORIN (46) führen nekrobiotische Vorgänge und akute Intoxikationen zu einem α-Globulinanstieg. Auch WEISE (45) fand bei seinen Arbeiten ausgeprägte Erhöhungen der α_2- und γ-Globuline bei malignen Tumoren. Eine ebenfalls häufig beobachtete Vermehrung der β-Fraktion schrieb er nekrotisierend einschmelzenden Gefäßprozessen bei neoplastischen Erkrankungen zu. Eine γ-Globulin-Erhöhung beschreibt er bei proliferativen Gewebsvorgängen als Antwort des RHS auf das Tumorwachstum.

ZETTEL und ENDRESS (48) fanden bei malignen Tumoren neben Albuminverminderung einen Anstieg der α- und γ-Komponenten. Sie postulierten allerdings eine Abhängigkeit der Eiweißveränderungen von der Tumorlokalisation und stehen damit im Widerspruch zu KIENHOLZ (30) und DORRER (12), sowie zu ESSLER, HEINZLER, und

WILD (13), deren Arbeiten eine Differentialdiagnose oder mögliche gesetzmäßige Beziehungen zwischen Tumor-Lokalisation und Eiweißbild ausschließen.

Während von HORN (28) und KIENHOLZ (30) beim Carcinom regelmäßiger einen Abfall des Gesamteiweißes beobachteten, beschreiben LOCHER (33) und ESSLER, HEINZLER und WILD (13) normale Gesamteiweißwerte bei malignen Tumoren.

Erst im Spätstadium bei hochgradiger Kachexie und Anorexie sowie bei chronischen Eiterungen fanden sie eine Abnahme des Gesamteiweißes.

Während mehrere Autoren eine deutliche Abhängigkeit des Elektrophoresebildes von der Strahlentherapie beschreiben, konnten wir diese Beobachtungen nicht bestätigen.

BAUER, OTT und PILLER (4) fanden eine Albuminverminderung bei gleichzeitigem Anstieg der α_2- und β-Globuline bei der Therapie der Krebskrankheit als reine Strahlenwirkung, die als völlig reversibel geschildert wird, allerdings soll diese Dysproteinämie in Abhängigkeit vom Allgemeinzustand des Patienten, vom Schweregrad des Tumors und von den Folgeerscheinungen stehen. Dem entsprechen auch die Ergebnisse von GOMBERT (16), wonach die Bestrahlung Krebskranker bei schlechtem Allgemeinzustand zu Albuminverminderung führt, bei gutem AZ dagegen sogar zu Albuminerhöhung.

HÖHNE, JOSTER und KÜNKEL (27) sowie STENDER und ELBERT (43) führten Röntgenbestrahlungen an Ratten

durch und gelangten unabhängig voneinander zu gleichen Ergebnissen, nämlich Albumin- und γ-Globulinverminderung bei erheblicher Steigerung der α- und β-Globuline. Das Ausmaß der Veränderungen wird dabei in Abhängigkeit von der Zeit nach der Bestrahlung gesehen.

VEIT (44) erklärt das Absinken der Albumine und den Anstieg der Globuline mit einem vermehrten Eiweißabbau nach Röntgen- und Radium-Behandlung. Als Beweis dafür wird die Vermehrung von Polypeptiden und freie Aminosäuren im Blut angeführt.

ANTWEILER (2) gibt bei Röntgenbestrahlung ein Absinken der γ-Globulin-Fraktion an, einen Anstieg der α- und β-Globuline und gleichbleibende Albuminwerte.

Zu gleichen Ergebnissen wie wir gelangten WIKTORIN (46) und BAYER (5), die keine größeren charakteristischen Veränderungen des Serumeiweißbildes bei Röntgen-Bestrahlung des weiblichen Genitalcarcinom beobachten konnten, höchstens geringfügige, uneinheitliche und kurzdauernde Verschiebungen.

BÜCHNER (7) und HEINEN, CZAJA, LOOSEN, ZERLETT (24) untersuchten die Bluteiweißverteilung bei körperlicher Belastung und fanden bei über 90 % der untersuchten Fälle Albuminverminderung und Globulinerhöhung.

Wenn wir das Carcinomwachstum selbst mit seinen Nebenerscheinungen wie Entzündungen und Einschmelzungen des umgebenden Gewebes als Belastung des Organismus betrachten wollen, so bietet dies eine mögliche

Erklärung für das Absinken der Albumine und den Anstieg aller Globulinfraktionen bei Portio-Carcinom-Trägerinnen. Dann wäre auch eine Abhängigkeit des Ausmaßes der Serumeiweißverschiebungen vom Stadium des Carcinoms erklärlich, wie sie von BAUER, OTT und PILLER (4), von DORRER (13), VEIT(44), ZETTEL und ENDRESS (48) postuliert wird.

Bei der Bewertung unserer Ergebnisse bleibt weiterhin das Alter der Patientinnen zu berücksichtigen. Wie oben bereits erwähnt,liegt das Durchschnittsalter bei 54,2 Jahren. KIENHOLZ (30) hat das Serumelektrophoresebild im Hinblick auf die Altersabhängigkeit untersucht und kam dabei zu folgendem Ergebnis:
Beim alten Menschen, speziell bei Personen über 65 Jahren fand sich eine Albuminverringerung von 50 bis 60 % auf 30 bis 40 %. Gleichzeitig trat eine etwa gleichmäßige Erhöhung aller Globulinfraktionen auf. Zu einem kleinen Teil mag diese Eiweißverschiebung, die wir bei den Carcinomträgerinnen im Vergleich mit Normalseren gefunden haben, sicher auf einer altersentsprechenden Veränderung beruhen, da die Kontrollpersonen im Durchschnitt nur etwa 30 bis 35 Jahre alt waren. Dies allein kann aber nicht der Grund für eine so hoch signifikante Albuminverminderung sein, da nur acht von 41 Patientinnen tatsächlich über der von KIENHOLZ (30) angegebenen Altersgrenze liegen.

Aufgrund unserer Untersuchungsergebnisse können wir in Übereinstimmung mit der heutigen Literatur aussagen, daß es beim Portio-Carcinom der Gruppen II bis IV zu einer signifikanten Verschiebung der Bluteiweißfraktionen kommt, und daß diese Veränderungen keineswegs spezifisch sind. Die Möglichkeit einer Frühdiagnose aus dem Serum-Elektrophoresebild scheint nach unseren Ausführungen nicht gegeben zu sein.

Der Wert dieser Methode für Verlaufskontrollen bleibt noch zu untersuchen.

Ein unmittelbarer Einfluß der Strahlentherapie, wie er von BAUER, OTT und PILLER (4), sowie von STENDLER und ELBERT (43) und VEIT (44) beschrieben wurde, scheint nur minimal zu sein und konnte nach unseren elektrophoretischen Untersuchungen nicht bestätigt werden.

Bisher ließen sich mit den herkömmlichen Methoden nur globale Veränderungen im Serumelektrophoresebild erkennen. Heute biete t uns aber die Immundiffusionsmethode die Möglichkeit, die einzelnen Proteine auch quantitativ zu erfassen. Unsere Ergebnisse wollen wir nun mit den bisher bekannten Befunden der Literatur konfrontieren: Bemerkenswert erscheint uns eine mit Hilfe der Immundiffusionsmethode gefundene schwach signifikante Erhöhung von β_1-A-Globulin und β-Lipoprotein bei den bestrahlten Patientinnen gegenüber dem Normalkollektiv. Weiter ergaben unsere quantitativen Untersuchungen bei Carcinomträgerinnen erhöhte Werte für saures α_1-Glykoprotein, Coeruloplasmin, Haptoglobin, IgA und IgG.

Dabei fand sich Transferrin erniedrigt.

Über entsprechende Ergebnisse berichten BECKER, RAPP, SCHWICK und STÖRIKO (6), die bei Malignomen eine Vermehrung von Coeruloplasmin und IgG bei Transferrinverminderung beschrieben. Den Anstieg des sauren α_1-Glykoproteins, des α_1-Antitrypsins und des Haptoglobins deuten sie als Folge entzündlicher Prozesse und traumatischer Gewebsveränderungen.

HEREMANN (25) fand ebenfalls Haptoglobin, Coeruloplasmin, saures α_1-Glykoprotein, α_1-Antitrypsin und α_2-Makroglobulin vermehrt bei Infektionen, Intoxikationen, akuten Entzündungen und bei fortschreitenden maligenen Traumen.

CLEVE und STROHMEYER (11) postulieren einen Zusammenhang zwischen dem Serumspiegel an saurem α_1-Glykoprotein und dem Ausmaß der Gewebsdestruktionen durch das Wachstum des malignen Tumors.

Eine ebenfalls enge Korrelation zwischen dem Ausbreitungsgrad des Tumors und dem Maß der Haptoglobinerhöhung fanden BUFFE, SCHWEISGUTH, LEMMERLE und BURTIN (9). Daneben berichten sie über Coeruloplasminerhöhungen bei Malignomen.

Ausgedehnte Untersuchungen von HAFERKAMP, SCHLETTWEINGSELL, SCHWICK und STÖRIKO (23) ließen bei zunehmendem Alter einen deutlichen Anstieg von IgG, IgA, saurem α_1-Glykoprotein, α_1-Lipoprotein, Coeruloplasmin und β-Li-

poprotein erkennen. IgM zeigte keine Altersabhängigkeit, aber der Antikörpertiter wurde erniedrigt gefunden.

Entsprechende Ergebnisse bezüglich des IgA- und IgG-Anstiegs im höheren Lebensalter veröffentlichte auch BRAUN (8). HEREMANN (25) fand eine Ähnlichkeit im Serumeiweißbild sehr alter klinisch gesunder Personen zu dem Eiweißspektrum bei den verschiedensten kachektischen Krankheiten.

Keinen, oder einen nur wenig typischen Befund geben SCHEIFFARTH, GÖTZ und BAIGGER (39) dort an, wo ein lokal begrenztes Tumorwachstum anzunehmen ist.

V. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit haben wir die Seren von Collumcarcinom-Trägerinnen vor und nach der Strahlentherapie im Vergleich mit einem Kollektiv klinisch gesunder Frauen untersucht. Besonders interessierte uns dabei die Frage nach spezifischen Eiweißverschiebungen beim Collumcarcinom und nach möglichen diagnostisch verwertbaren Veränderungen.

Nach einem Überblick über die bisher gebräuchlichen Labormethoden zur Differenzierung der einzelnen Eiweißfraktionen beschrieben und erklärten wir die von uns untersuchten Eiweißkomponenten des menschlichen Blutserums.

Im methodischen Teil gingen wir genau auf die Mikrozonen-Elektrophorese auf Zellulose-Acetat-Folie und auf die einfache radiale Immundiffusion auf Partigen(R)-Platten ein.

Es erfolgte die Zusammensetzung des Patientengutes und die Behandlung.

Nach Zusammenstellung und Besprechung unserer Ergebnisse verglichen wir diese mit der Literatur.

Beim Collumcarcinom fanden wir in der Mikrozonen-Elektrophorese eine deutliche Albuminverminderung zugunsten aller Globulinfraktionen.

Die Immundiffusionsmthode ergab eine Vermehrung des sauren α_1-Glykoproteins, des Coeruloplasmins, des Haptoglobins, des IgA und des IgG. Dagegen fanden wir Albumin, α_2-Makroglobulin, Transferrin und IgM signifikant erniedrigt.

Die von mehreren Autoren beschriebene Abhängigkeit der Eiweißzusammensetzung von der Strahlentherapie konnten wir nicht bestätigen.

Die gefundenen Serumeiweißveränderungen sind unspezifisch und lassen keine diagnostischen oder prognostischen Schlüsse zu.

Literaturverzeichnis

1) ALY, F. W. — Klinische Erfahrungen mit einem nicht virilisierenden, oral wirksamen Testosteron-Derivat. Med. Welt 47, 2468-2473, 1961

2) ANTWEILER, H. J. — Die quantitative Elektrophorese in der Medizin. Springer-Verlag, 1952

3) BACKHAUSZ, Dr. R. — Grundlagen, Methoden, Ergebnisse. VEB Gustav-Fischer-Verlag, 1967

4) BAUER, R., OTT, H. und PILLER, S. — Ergebnisse elektrophoretischer Serumuntersuchungen am Serumeiweißbild bestrahlter Krebskranker. Strahlentherapie 94, 12-22, 1954

5) BAYER, H. — Die Bedeutung von Serumproteinbestimmungen bei der nachgehenden Karzinomfürsorge. Zentralbl. Gynäk. 85, 701-711, 1963

6) BECKER, W. RAPP, W. SCHWICK, H. G. und STÖRIKO, K. — Methoden zur quantitativen Bestimmung von Plasmaproteinen durch Immunpräzipitation. Zeitschr. klin. Chem. u. klin. Biochem. 6, 113-122, 1968

7) BRAUN, H. J. — Die quantitative Bestimmung der Immunglobuline. Therapiewoche 17, 1967

8) BÜCHNER, M.
Moderne chemische Methoden der Klinik.
VEB Georg-Thieme, 1958

9) BUFFE, D.
SCHWEISGUTH, O.
LEMMERLE, J. et
BURTIN, P.
Étude immuno-électrophorétique des protéins sériques d'enfants porteurs de tumeurs.
(Neuroblastome et néphroblastome)
Bull. Cancer 54, 185, 1967

10) BURTIN, P.
Die normalen Plasmaproteine:
GARBAR, P. und BURTIN, P.:
Immunoelektrophoretische Analyse.
Elsevier Publ. Amsterdam, London, New York, 1964

11) CLEVE, H. und
STROHMEYER, G.
Quantitative Variationen von Serumglykoproteinen bei pathologischen Prozessen; Bestimmung von saurem α_1-Glykoprotein, Gc und α_2-Makroglobulin mit der radialen Immundiffusion.
Klin. Wsvhr. 45, 1051, 1967

12) DORRER, R.
Bluteiweißveränderungen bei malignen Tumoren.
Landarzt 42, 51-52, 1966

13) ESSER, H.
HEINZLER, F. und
WILD, H.
Serumeiweißwerte beim Carcinom.
Klin. Wschr. 321-323, 1953

14) FUMAGALLI, P.
Veränderungen im Serumeiweißbild nach Radiumbestrhalung bei Kollumcarcinom.
Diss. Med., Bonn 1955

15) GLEICHMANN, E. und DEICHER, H.
Quantitative Immunglobulinbestimmungen im Serum bei entzündlichen Leberkrankheiten. II. Chronisch entzündliche Lebererkrankungen.
Klin. Wschr. 46, 793-802, 1968

16) GOMBERT, H. J.
Über Serum-Eiweißveränderungen bei Primär- bzw. Nachbestrahlung maligner Tumoren.
Klin. Wschr. 120-123, 1952

17) GOTTESLEBEN, A. und BAUER, H. J.
Quantitative Immunochemie der Liquorproteine bei entzündlichen Erkrankungen des Nervensystems.
Germ. Med. Monßth. Vol. XII, 7, 331-334, 1967

18) GRAF, H.
Serumeiweißveränderungen bei Kollumcarcinomen vor und während der Bestrahlung. Beitrag zum Studium der körpereigenen Abwehrfunktion.
Med. Welt 16, 1956, 1965

19) GRAF, H.
Serumeiweißveränderungen bei Kollumcarcinomen vor und während der Bestrahlung.
Med. Welt 16, 2043, 1965

20) GRASSMANN, W. und HANNIG, K.
Beiträge zur Methodik der Papierelektrophoretischen Serumanalyse.
Klin. Wschr. 32, 838-846, 1954

21) GRASSMANN, W., HANNIG, K. und KNEDEL, M.
Über ein Verfahren zur elektrophoretischen Bestimmung der Serumproteine auf Filterpapier. Dtsch. Med. Wschr. 76, 333-336, 1951

22) GUGLER, E. von MURALT, G. und BÜTLER, R.
Die immunelektrophoretische Analyse der menschlichen Serumproteine. Schweiz. Med. Wschr. 89, 703-709, 1959

23) HAFERKAMP, O. SCHLETTWEIN-GSELL, SCHWICK, H. G. und STÖRIKO, K.
Serumproteine im hohen Lebensalter unter besonderer Berücksichtigung der Immunglobuline und Antikörper. Klin. Wschr. 44, 725, 1966

24) HEINEN, W. CZAJA, J. LOOSEN, H. und ZERLETT, G.
Elektrophoretische Untersuchungen nach dosierter körperlicher Belastung. Ärztl. Wschr. IX, 968-970, 1954

25) HEREMANN, J. F.
Die Immunelektrophorese und ihre klinische Bedeutung. Ergebn. Innere Med. u. Kinderheilk. 20, 169-257, 1963

26) HITZIG, W.
Die Plasmaproteine in der klinischen Medizin. Springer-Verlag 1963

27) HÖHNE, G., JASTER, R. und KÜNKEL, H. A.
Elektrophoretische Untersuchungen am Serum röntgenbestrahlter Ratten. Klin. Wschr. 952, 1952

28) von HORN, U.
Das Serumeiweißbild beim Genitalcarcinom.
Diss. Med. Homburg, 1963

29) KANZOW, U. und ROSENKRANZ, W.
Immunglobuline bei Gesunden und Patienten mit einer Paraproteinämie.
Klin. Wschr. 45, 1037-1041, 1967/

30) KIENHOLZ, M.
Aussagekraft der Elektrophorese.
Therapie der Gegenwart, 82-95, 196

31) LACKNER, Dr. J.
Bluteiweißveränderungen bei Trägern maligner Tumoren.
Strahlentherapie 90, 509-513, 195

32) LEIPERT, T.
Die Funktion der Plasmaeiweißkörper.
Dtsch. med. J. 14, 395-399, 1963

33) LOCHER, R.
Das elektrophoretische Serumeiweißbild bei der Krebskrankheit.
Diss. Med. Berlin 1952

34) MARGHESCU, S.
Über die quantitative Bestimmung der Immunglobuline und der Komplementaktivität im Blutserum bei Dermatosen.
I. Einleitung, Methoden und ihre kritische Beurteilung.
Arch. Klin. u. Exp. Dermatologie 2
Bd. 120-129, 1968

35) MÄRKI, H. H.
WUHRMANN, F. und
LARGIADÈRE, A.
Zur Bedeutung der immunoelektrischen Typendifferenzierung von γ_2-Myelomparaproteinen.
Klin. Wschr. 43, 677-680, 1965

36) PETERMANN, M. J.
Plasmaprotein abnormalies in cancer.
Med. Clin. N. Amer. 45, 537, 1961

37) RÖL, J.,
CHOTT, L. und
ŘÍHOVÁ
Ein Fall von Myelom und Bildung zweier in antigener Hinsicht unterschiedlicher Paraproteine.
Klin. Wschr. 44, 1117-1119, 1966/II

38) REIN SCHNEIDER
Physiologie des Menschen.
Springer-Verlag 1964

39) SCHEIFFARTH, F.,
GÖTZ, H. und
BAIGGER, E.
Immunelektrophoretische Phänomene bei der Analyse pathologischer Seren.
Med. Welt 48, 2442-2448, 1963/II

40) SCHEURLEN, P. G.
Immunologische Untersuchungen an heterogen zusammengesetzten Plasmocytom-γ-Globulinen.
Klin. Wschr. 723-727, 1963

41) SCHMIDT, R.
Zum Antikörpermangelsyndrom.
Landarzt 38, 1366-1368, 1962

42) SCHWICK, G. und
STÖRIKO, K.
Qualitative und quantitative Plasmaproteinbestimmung durch Immunpräzipitation.
Laboratoriumsblätter (Behring-Werke) 1965

43) STENDER, H. St. und ELBERT, O. Tierexperimentelle Untersuchungen über die Beeinflussung des Serumeiweißbildes durch eine Ganzbestrahlung mit 500 und 1000 R. Strahlentherapie 89, 275-282, 1953

44) VEIT, H. Das Verhalten der Serumproteine bei der Bestrahlung gynäkologischer Erkrankungen. Strahlentherapie 90, 148-153, 1953

45) WEISE, H. J. Die Bedeutung der elektrophoretischen Analyse des Eiweißbildes für die Praxis. Fortschr. Med. 81, 853-858, 1961

46) WIKTORIN, E. Das Serumeiweißbild bei Patientinnen mit Kollumcarcinom unter der Röntgenbestrahlung. Diss. Med., Bonn 1956

47) WUHRMANN, F. und WUNDERLY, Ch. Die Bluteiweißkörper des Menschen. Benno Schwabe & Co. Verlag, Basel 1952

48) ZETTEL, H. und ENDRESS, M. Das Serumeiweißbild beim Carcinom. Chirurg. 24, 498-502, 1953

An dieser Stelle möchte ich Herrn Professor Dr. med. H. LIMBURG für die Überlassung des Themas danken.
Mein besonderer Dank gilt Herrn Privatdozent Dr. med. G. LOSKANT für unermüdliche Beratung und Hilfe bei der Ausführung meiner Arbeit.
Weiterhin danke ich Herrn Dr. med. W. RINDT für viele nützliche Hinweise und freundliche Unterstützung.

L e b e n s l a u f

Am 10. Februar 1944 wurde ich als einziges Kind des Lehrers Richard Welker und seiner Ehefrau Anna Katharina geb. Zenner geboren.

Ostern 1950 trat ich in die katholische Volksschule Birkenfeld ein, Ostern 1954 in das Staatliche neusprachliche Gymnasium Birkenfeld, wo ich im März 1963 die Reifeprüfung ablegte. Im Mai 1963 begann ich das Studium der Medizin an der Universität des Saarlandes und legte im Mai 1964 die Naturwissenschaftliche Vorprüfung ab.

Im September 1966 bestand ich in Homburg die Ärztliche Vorprüfung und im Dezember 1969 das Staatsexamen.

Ab 1. Januar 1970 bin ich in Birkenfeld/Nahe als Medizinalassistent tätig.